

(11)Publication number : 09-110707

(43)Date of publication of application : 28.04.1997

(51)Int.Cl.

A61K 35/74

A61K 35/74

(21)Application number : 07-289222

(71)Applicant : WAKAMOTO PHARMACEUT CO
LTD

(22)Date of filing : 12.10.1995

(72)Inventor : HIDA YOSHIO
AIBA TAKESHI
SUZUKI NOBUYUKI
KOKUBO NAOMI
HIRATA HARUHISA
OHASHI YOSHITAMI
MAEDA MAKOTO
KOGA YASUHIRO

(54) CHRONIC RENAL FAILURE-IMPROVING AGENT AND QUALITY OF LIFE IMPROVER FOR DIALYSIS PATIENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a chronic renal failure-improving agent which contains lactic bacillus preparation as an active ingredient, improves the enterobacterial flora in dialysis patient, inhibits the formation of intestinally spoiled product and reduces indoxyl sulfate as a toxic component in uremic poisoning in blood.

SOLUTION: This improving agent contains a lactic bacillus preparation as an active ingredient. As a lactic bacillus preparation, are cited the Bifidobacterium, lactomin or Lactobacillus preparation outside the Pharmacopoeia standards. In an embodiment, for example, a commercially available antibiotic resistant Lactobacillus preparation containing 1×10^8 cfu of Bifidobacterium infantis, of Lactobacillus acidophilus and of Enterococcus faecalis, respectively, and totally 3×10^8 cfu/capsule is used.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 08.10.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 10.04.2007

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Quality of the chronic-renal-failure improvement agent which makes Lactobacillus preparation an active principle, and a dialysis patient OBU The LIFE improvement agent.

[Claim 2] Quality of the chronic-renal-failure improvement agent according to claim 1 and dialysis patient as whom Lactobacillus preparation is chosen from Japanese-Pharmaceutical-Codex lactobacillus bifidus, Japanese-Pharmaceutical-Codex lactomin, and Japanese-Pharmaceutical-Codex antibiotics-resistant lactic acid bacteriae OBU The LIFE improvement agent.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention is the improvement of chronic renal failure, and a dialysis patient's quality. OBU It is related with drugs effective for an improvement of LIFE (quality of life, QOL).

[0002]

[The trouble which a Prior art and invention should solve] The dialysis patient in Japan broke through 110,000 people at last in 1993, and about 10,000 or more people newly join dialysis installation every year. Moreover, a health care cost per capita [concerning dialysis] becomes the moon of 800,000 yen, and the yearly amount of 9,600,000 yen, and a huge amount of costs which the total health care cost of dialysis patients all over the country calls about 1 trillion yen are used. This frame is equivalent to 1/24 to what and the gross national medical expenditure of 24 trillion yen.

[0003] Although a patient's early detection and early treatment from which it suffered to kidney disease are just going to desire in order to suppress the increment in a dialysis patient, the

remedy effective now is not found out yet. Even if it links directly the diabetic nephropathy which is especially one of the diabetic complication with a patient's vital prognosis and it introduces dialysis, it will show 50% of death rate in about three years, and its vital prognosis will be very bad.

[0004] Under the therapy of chronic renal failure by which current operation is carried out, besides pharmacotherapy, such as alimentary therapy centering on low protein diet, and a hypotensor, a pressure-lowering diuretic, etc., it aged 1991 and adsorbent Kremezín for chronic renal failure (trademark) (Kureha chemistry-3) appeared as drugs. These drugs are the drugs which aimed at delay of dialysis installation and were developed by stopping an improvement of a uremia symptom and a decreased renal function as much as possible based on a new action mechanism.

[0005] Although some views are advocated about progress and exacerbation of chronic renal failure, it considers uremic toxin (uremic toxin), uremia nature metabolite, etc. being accumulated in the inside of the body, if an elimination function falls to one of them by renal dysfunction, and these worsening renal failure further, and causing a vicious circle.

[0006] Indoxyl sulfate attracts attention recently as one of the acidity-or-alkalinity exacerbation factors of such renal failure. Although a protease hydrolyzes, the protein taken in as a meal serves as a low-molecular peptide or amino acid and most is absorbed from a small intestine, non-absorbed a peptide and amino acid are metabolized by the enteric microbe. Although a tryptophan is changed into Indore and it is excreted in facilities as it is also in it, a part is absorbed from an intestinal tract, rides on a blood flow, and is carried to a liver, and conjugation is carried out as indoxyl sulfate after changing into indoxyl by the liver.

[0007] Usually, although this indoxyl sulfate will be excreted in urine through a kidney if it is healthy people, in the patient to whom renal dysfunction was caused, this matter stores in the inside of the body, and it is pointed out that this is in progress and exacerbation of chronic renal failure as Seki greatly.

[0008] Oral-administration-adsorbent Kremezín for chronic renal failure (trademark) is capsule pharmaceutical preparation which consists of a globular form high grade carbon particle with a diameter of 0.2-0.4mm, divides one capsule 200mg and the one-day dose of 6g into a ter die, and is taken.

[0009] Although absorption of the putrefaction product from an intestinal tract is suppressed as much as possible when such an adsorbent adsorbs putrefaction products generated in intestines, such as phenols and Indore, these adsorbents are not the nutrient of vitamins and others important for a living body, and the pharmaceutical preparation which sticks to a digestive enzyme etc. further and can adsorb only a putrefaction product alternatively. Furthermore, it becomes a big burden to continue drinking a lot of adsorbents which the chronic-renal-failure patient is having forced a strict moisture limit, and it says once are ten capsules, in view of a patient's QOL a ter die and every day, and it is never a desirable thing. Moreover, the feeling of abdomen expansion after recipe is begun, and a patient's QOL is not made to necessarily satisfy in many cases with the side effect of digestive systems, such as a constipation symptom, and anorexia, nausea or vomiting. Drugs which control generation of the putrefaction product in intestines, and suppress progress and exacerbation of chronic renal failure in view of such the present condition, and raise a patient's QOL are desired.

[0010]

[Means for Solving the Problem] this invention persons traced that the Lactobacillus preparation already approved as drugs was very effective, as a result of inquiring wholeheartedly in view of this actual condition to invention of renal failure improvement medicine which thought QOL of chronic renal failure and a dialysis patient as important.

[0011] Originally, Lactobacillus preparation is the drugs which efficacy is accepted as a drug for controlling intestinal function, and were extremely excellent in safety from a long use experience.

[0012] It is gradually clarified also about the operation which lactobacillus bifidus, the Lactobacillus Lactobacillus acidophilus, etc. which are the active principle of Lactobacillus preparation lived in intestines as enterobacilli of Homo sapiens or an animal from the latest

research, and it has become clear that work very important for health maintenance is carried out, and is shown below.

[0013] (1) Control generation of harmful matter, such as a carcinogenic substance.

(2) Prevent the enteral infection of a disease germ.

(3) Suppress growth of the destructive fungus in intestines.

(4) Compound a vitamin (vitamin-B1 , B-2, B6, B12, K).

(5) Help digestion and absorption.

(6) Raise immunological competence.

[Mitsuoka contentment: The world of an enteric bacterium, Soubunsha (1980)]

[0014] It is thought that each of these operations is based on the work which corrects the imbalance of the intestinal flora of Lactobacillus preparation. When the balance of an intestinal flora collapsed from the former, it was pointed out that there is a danger of causing a critical infectious disease.

[0015] Although the delay of past [usage] and the cure against a hospital infection of broad spectrum antibiotics was pointed out and became a big point examining itself, especially as for the MRSA infection which deepened confusion increasingly in the medical site recently, and also became a social problem, collapse of the balance of the intestinal flora by broad spectrum antibiotics is participating also in this infectious disease deeply.

[0016] namely, anaerobic bacteria, such as Bifidobacterium which forms healthy people's intestinal flora as a result of this invention persons' searching a patient's feces whose symptoms were shown with the MRSA bacillus, the Lactobacillus group, Eubacterium, Bacteroides, and Clostridium, -- completely -- ** -- it was not detected, so that you could say, but the MRSA bacillus of aerobe was detected so much instead. Also seen from formation of infection, or the position of the phylaxis, he can understand from this how an intestinal flora is important.

Therefore, the relation by human health and the intestinal flora is very important.

[0017] On the other hand, it was an important matter, also in order for there to be almost no example which analyzed a stationary phase dialysis patient's intestinal flora and to complete this invention. As mentioned above, he is the basis of a limit of moisture, a dialysis patient takes in the dialysis foods which made the subject a high calorie, a high fat, low protein, and low dietary fiber foods, and there are also many cases in which the peristalsis of an intestinal tract is also decreasing further, and he encounters the case which the union of constipation also often experiences. Consequently, the dialysis patient may consist of different intestinal floras from health people, and is considered to be one of the factors in which the abnormalities of this intestinal flora have completed are recording in the blood of uremic toxin, and a compromised condition.

[0018] Then, as shown in the example of a comparison, this invention persons performed the comparison of the strain and number of microorganism which constitute the intestinal flora of healthy people and a dialysis patient, and showed the result in Table 1. Compared with a healthy person, the detection ratio of lactobacillus bifidus with it of a dialysis patient's intestinal flora is also low so that clearly from Table 1. [the high and ratio of aerobe and] [useful to Homo sapiens] Furthermore, the fall of immunological competence is also pointed out and a dialysis patient has the danger of it multiplying by a patient's compromised condition the dialysis patient having been permitted opportunistic infection bacilli, such as a Staphylococcus group,

Enterococcus or Klebsiella, and Pseudomonas, with the high detection ratio, and causing a serious opportunistic infection. The abnormalities of the intestinal flora in such a dialysis patient will not become clear without this invention persons.

[0019] Then, this invention persons were the purposes which improve QOL of chronic renal failure and a dialysis patient while having improved the abnormalities of an intestinal flora, medicated the dialysis patient with the Lactobacillus preparation approved as drugs at the actual clinical place, and analyzed by repeating analysis about the analysis of the intestinal flora before and behind administration, the uremic toxin component, and the putrefaction product (a phenol, the Parakou resol, Indore, skatole). Consequently, not only the improvement of the intestinal flora in a dialysis patient but also reduction of the indoxyl sulfate in generation control and blood of the putrefaction product in intestines was accepted. As for this result, recipe of Lactobacillus

preparation shows *Lycium chinense* with an epilogue to the improvement of chronic renal failure, and the improvement of a dialysis patient's QOL.

[0020]

[Example] The example of a comparison used as the start of this invention is shown below, and it states to a detail.

[The example of a comparison]

<< -- comparison >> of the intestinal flora of healthy people and a dialysis patient -- healthy people -- 12 persons (six men and six women) In order to investigate the intestinal flora before Lactobacillus preparation administration of 49.2**6.8 years old of average age, and 20 dialysis patients (eight men, 12 women, 56.4**12.8 years old of average age) Mitsuoka's and others approach [Microbiol.Immunol., 36,683-694 (1992), According to Zentralbl.Bakteriol. and 1Abt.Orig.A195:455-469(1965)], about 1g of fresh feces was extracted, and dilution was gradually performed 10 times from 10⁻¹ by 10⁻⁸ after suspension under the anaerobic condition. It extended on 13 kinds of agger plates of a selective medium which show 0.05ml of the diluent in each to the agger plate of three kinds of non-selective media, TS, EG, and BL, and the following.

[0021] Staphylococcus culture-medium No.110 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) containing DHL, TATAC, PEES, P and NAC [the culture medium for the *Pseudomonas* detection (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.)], NGBT, BS, ES and VS, the strange methods LBS and NN, CCFA [the culture medium for the *Clostridium* differential-gear sill detection (OKUSOIDO, Britain)], 2.5% of yolk, and 5microg [/ml] methicillin [MRSA and the culture medium for MSSA detection].

[0022] For 37 degrees C and two days, the incubation of the plate for anaerobic-bacteria detection was carried out for three days, and 37 degrees C of plates for aerobe detection judged it the back from the growth situation under the colony configuration on each plate, the gestalt of a cell, a Gram's stain, sporulation ability, aerotropism, and anaerobic conditions, and they performed attribution of a classification of various bacteria and yeast.

[0023] Although the result was shown in Table 1, the numeric value of Table 1 shows the number of micro organisms per 1g of feces (colony forming unit, cfu) by the common logarithm, and the numeric value of () asks for a rate from the number by which each bacillus was detected in healthy people 12 persons or 20 dialysis patients, and expresses this as a detection ratio.

[0024] <<analysis result>> From the result of Table 1, a dialysis patient's feces bacterial flora had the intentionally high number of microorganism of Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae) as compared with it of healthy people, showed enterococcus (Enterococcus) mist and high number of microorganism, and was understood that the ratio of aerobe is high on the whole. Furthermore, compared with healthy people, the dialysis patients of the detection ratio of the Staphylococcus group which attracts attention as a reason bacillus of an opportunistic infection, or *Pseudomonas* were high prices.

[0025] On the other hand, although detected from all healthy people about the lactobacillus bifidus of anaerobic bacteria (100% of detection ratios), in a dialysis patient, the number of microorganism is also low at 65% of detection ratio. Moreover, *Clostridium PAFURINJIENSU* which attracts attention in connection with aging recently had [number of microorganism and a detection ratio] high dialysis patients, and the total bacterial count was understood that dialysis patients are low a little.

[0026] As mentioned above, the dialysis patient had the generally high ratio of aerobe as compared with healthy people, and the analysis of a feces bacterial flora showed having a considerably different intestinal flora from healthy people's intestinal flora.

[0027] Although an example is given to below and this invention is further explained to it at a detail, this example indicates one mode of this invention, and this invention is not limited to this.

[Example 1]

medication method>> of <<"Lebenin (trademark)" capsule -- 20 dialysis patients (eight men, 12 women, 56.4**12.8 years old of average age) -- the "Lebenin (trademark)" capsule -- after a meal -- 1 time, one capsule, and a ter die -- it was made to take for four weeks It collected blood with a patient's fresh feces after two weeks, and collected blood again after two more weeks, and analysis was presented.

[0028] the antibiotic antibiotics-resistant-lactic-acid-bacteriae pharmaceutical preparation with

which the "Lebenin (trademark)" capsule was recognized as an ethical drug -- it is -- one capsule 200mg -- it is the pharmaceutical preparation which becomes inside from three strains of Bifidobacterium in fan TISU 1×10^8 cfu, Lactobacillus acid FIRUSU 1×10^8 cfu, and enterococcus FEKARISU 1×10^8 cfu, and contains 3×10^8 cfu / capsule in it as a total bacterial count.

[0029] << -- retrieval >> of the intestinal flora after the "Lebenin (trademark)" capsule administration -- retrieval of a dialysis patient's feces bacterial flora followed the same approach using the various selective media and the non-selective medium which were shown in the example of a comparison.

[0030] <<retrieval result>> Compared with recipe or before, as for the klebsiella which a reduction significant about Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae) as change of the feces bacterial flora of the dialysis patient who took the "Lebenin (trademark)" capsule is accepted, and can become the reason bacillus of an opportunistic infection from the result of Table 2, Staphylococcus, Pseudomonas, and Candida, number of microorganism and a detection ratio decreased.

[0031] On the other hand, about anaerobic bacteria, it was before and after recipe, and to the detection ratio of lactobacillus bifidus having increased from 65% to 90%, Clostridium PAFURINJIENSU decreased from 70% to 20%, and saw the increment in some with the total bacterial count. As mentioned above, the improvement of an intestinal flora was accepted by recipe of the "Lebenin (trademark)" capsule.

[0032] Analysis [of the phenols in <<feces, and Indore] >>

It extracts about 0.5g of feces of 12 healthy persons and 20 dialysis patients at a time. (Analytical method) Add the PARAISO propyl phenol of 10mM(s) every [10micro / l] as an internal standard, consider as acidity, add [add 0.5ml of 1-N hydrochloric acids,] diethylether, and mixture is improved. The upper layers were collected, the bicarbonate od soda of 0.5M could be added again, at-long-intervals alignment separation was performed [at-long-intervals alignment separation was performed for 3,000 rotations and 15 minutes,] after mixture for 3,000 rotations and 15 minutes, and phenols and Indore were extracted. It analyzed from the ether layer including phenols or Indore by pouring 5microl after **** and in a gas chromatography by the micro syringe.

[0033] The Measuring condition of a gas chromatography is as follows.

analysis apparatus: -- Shimazu GC-9A detector: -- hydrogen flame detection (FID)

Carrier gas: It is a column:glass column (die-length [of 2.1m] x diameter of 3mm) by helium (helium) and 50ml/.

Bulking agent: 14% silicon SE-30 Chromosorb W AW-DWCS (80-100 meshes)

Temperature: 110 degrees C (constant temperature)

[0034] (Analysis result) The amount of nanomoles of the phenols per 1g of feces and Indore shows to an axis of ordinate, and drawing 1 is "Lebenin (before trademark)" capsule recipe and the recipe back are shown.) of healthy people and a dialysis patient to an axis of abscissa.

[0035] There were most Parakou resols among phenols among healthy people and dialysis patients, and, subsequently it was the order of skatole, Indore, and a phenol. When the amount of the phenol of healthy people and the dialysis patient before recipe and after recipe was measured, one example was the value which showed the value with a high dialysis patient and bore a strong resemblance to other healthy people by the request. However, Indore, skatole, and the Parakou resol were high values in the dialysis patient compared with healthy people. As a result of recipe of the "Lebenin (trademark)" capsule to the dialysis patient for two weeks, Indore, the Parakou resol, and skatole decreased and the improvement of the intestines milieu interne was found.

[0036] Indoxyl sulfate in phenol [in <<plasma], Parakou resol, and plasma analysis->>

(Analytical method)

O Perform blood collecting of 12 analysis healthy persons of the phenol in plasma, and the Parakou resol, and 20 dialysis patients. The PARAISO propyl phenol of 1mM is added every [5micro / l] as internal standard matter to 0.1ml of plasma with which plasma might be separated. 10micro of 4-N hydrochloric acids I was added, it considered as acidity and 0.1g of

salt was added, after the dissolution, it was easy to add 0.2ml ethyl acetate, it carried out mixture, at-long-intervals alignment separation was performed for 3,000 rotations and 15 minutes, and it analyzed from the ethyl acetate layer by pouring 5microl after **** and in a gas chromatography by the micro syringe.

[0037] The Measuring condition of a gas chromatography is as follows.

analysis apparatus: — Shimazu GC-9A detector: — hydrogen flame detection (FID)

Carrier gas: It is a column:glass column (die-length [of 2.1m] x diameter of 3mm) by helium (helium) and 50ml/.

Bulking agent: 14% silicon SE-30 Chromosorb W AW-DWCS (80-100 meshes)

Temperature: 100 degrees C (constant temperature)

[0038] O Blood collecting of 12 analysis healthy persons of the indoxyl sulfate in plasma and 20 dialysis patients was performed, the 0.3-N hydrochloric acid was made into equivalence, in addition acidity at 0.1ml of plasma with which plasma might be separated, water saturation chloroform 0.1ml could be added, mixture was carried out, at-long-intervals alignment separation was performed for 10,000 rotations and 15 minutes, and it analyzed from the water layer by pouring 4microl after **** and in high performance chromatography by the micro syringe. In addition, on the occasion of the quantum, the standard curve was beforehand created using the indoxyl sulfate (sigma company) of a preparation, and this was used.

[0039] The Measuring condition of high performance chromatography is as follows.

analysis apparatus: — Shimazu LC-6A detector: — Shimazu SPD-6A and UV detection (wavelength of 270nm)

Column: An ODS silica gel column, YMC-PackA -312 (YMC Co., Ltd.) (die-length [of 150mm] x diameter of 6.0mm)

mobile phase: — sodium-potassium phosphate buffer solution [of 20mM(s) containing tetrapod-normal-butyl ammonium hydro KISAIDO of 1mM] (pH6.5): — an acetonitrile (75:25 v/v)

The rate of flow: A part for 1ml/[0040] (Analysis result) Drawing 2 shows the comparison of the uremic toxin component in the plasma before dialysis of healthy people and a dialysis patient and after dialysis. The amount of nanomoles of the phenol which is an uremic toxin component per 1ml of plasma, the Parakou resol, and indoxyl sulfate was expressed to the axis of ordinate, and the patient before healthy people and dialysis and the patient after dialysis were shown on the axis of abscissa.

[0041] Although a phenol, the Parakou resol, and the indoxyl sulfate that is the sulfate conjugation object of Indore are accumulated so much compared with healthy people into the plasma of the patient before dialysis and about 60% is removed about a phenol by dialysis so that clearly from drawing 2, it is shown that the Parakou resol and indoxyl sulfate are removable only about about 10 to 20%.

[0042] It is thought that these uremic toxin component riding on a blood flow when indoxyl sulfate is considered also in the uremic toxin component as one of the acidity-or-alkalinity exacerbation factors of renal failure and a dialysis patient's QOL is considered, and repeating general circulation influences a dialysis patient's vital prognosis greatly.

[0043] Drawing 3 makes a dialysis patient take the "Lebenin (trademark)" capsule for a maximum of four weeks, and pursues the indoxyl sulfate which is one of the uremic toxin components recipe before and after recipe. The significant difference was not accepted although the case which decreased about the phenol or the Parakou resol was accepted (data are not shown). However, about indoxyl sulfate, the 2nd week showed the downward tendency, and it decreased intentionally in the 4th week ($p < 0.01$).

[0044] (Clinical manifestation) Drawing 4 observes the shape of fecal [for the 2nd week] the dialysis patient's "Lebenin (trademark)" capsule recipe front and after recipe. a criterion — a loose passage (81% or more of moisture) — facilities (71 - 80% of moisture) and hard feces (70% or less of moisture) usually showed.

[0045] 45% of patients who presented hard feces before the "Lebenin (trademark)" capsule recipe decreased in number to 25% after recipe, and have usually been improved by facilities so that clearly also from drawing 4.

[0046] [Example 2]

medication method>> of <<"RORON(trademark) S" tablet -- a total of ten dialysis patients (66.1**15.5 years old of average age) of five boys and five women -- "RORON(trademark) S" lock -- after a meal -- 1-time two locks, and a ter die -- the object for spring suits was carried out for one month. One month after, a patient's fresh feces were extracted and analysis of a feces bacterial flora and a putrefaction product was performed.

[0047] "RORON(trademark) S" locks are the Japanese-Pharmaceutical-Codex lactobacillus bifidus recognized as an over-the-counter drug, and Lactobacillus preparation which consists of Japanese-Pharmaceutical-Codex lactomin, and are pharmaceutical preparation which consists of three strains of Bifidobacterium longum 6x10⁷ cfu, Bifidobacterium bifidum 6x10⁷ cfu, and Lactobacillus acid FIRUSU 6x10⁷ cfu into a 1-time dose (two locks) by the white lock with one lock of 200mg, and contains 1.8x10⁸ cfu/2 lock as a total bacterial count.

[0048] Searching method>> of <<dialysis patient's intestinal flora Retrieval of an intestinal flora followed the same approach using the various selective media and the non-selective medium which were shown in the example of a comparison.

[0049] <<retrieval result>> In the dialysis patient before "RORON(trademark) S" lock recipe, compared with healthy people, intentionally, number of microorganism was high, number of microorganism was high also in Enterococcus and the Staphylococcus group which attract attention as a reason bacillus of an opportunistic infection further, and Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae) and Candida presented the bacterial flora which was rich in aerobe so that more clearly than Table 3. On the other hand, Bifidobacterium detected healthy people 100% in anaerobic bacteria stopped at about 50% of detection ratio by the dialysis patient, and the number of microorganism was also intentionally low. These things are well in agreement with the results before the "Lebenin (trademark)" capsule recipe shown in the example 1.

[0050] However, Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae) and Candida decreased to extent a significant difference is not accepted to be compared with healthy people, and, on the whole, reduction in aerobe was accepted [that the reduction in some is accepted in the detection ratio of a Staphylococcus group, etc. and] by the continuation recipe for ["RORON(trademark) S" lock] one month.

[0051] On the other hand, although change was not seen by the number of microorganism of Bifidobacterium about anaerobic bacteria this time, in respect of the detection ratio, it increased to 70% from 50%, and, as for the number of microorganism of Clostridium used as the saprogenic bacteria in intestines, the reduction in some was seen. As mentioned above, the improvement was accepted in the intestinal flora in a dialysis patient by recipe of "RORON(trademark) S" lock.

[0052] Analysis [of the phenols in <<feces, and Indore]>>

(Analytical method) Extracting about 0.5g of six dialysis patients' feces at a time, the extract approach of phenols and Indore followed the example 1.

[0053] The Measuring condition of a gas chromatography is as follows.

analysis apparatus: -- Hewlett Packard HP6890 detector: -- hydrogen flame detection (FID)
carrier gas: -- a part for (Helium helium) 1.32ml/-- column: -- J&W SCIENTIFIC (California, USA)

Capillary column (die-length [of 30m] x diameter of 250 micrometers)

5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane (crosslinking bond mold)

Temperature: A part for 50 degrees C -> 180 degrees-C and programming-rate/of 20 degrees C

[0054] (Analysis result) As shown in Table 4, as a result of analyzing the phenol in the feces before and behind recipe of "RORON(trademark) S" lock, the Parakou resol, Indore, and the putrefaction product of skatole, although individual difference was large about the phenol and the Parakou resol, the reduction in some was seen. There are very few amounts of generation of Indore in the feces of the dialysis patient before recipe this time, and since change was not seen after recipe of "RORON(trademark) S" lock, Indore is considered that the condition with the good patient itself is maintained. On the other hand, since it was decreasing sharply compared with recipe before in skatole, it became clear that long-term recipe of "RORON(trademark) S" lock is useful to the improvement of a dialysis patient's intestinal flora and control of the putrefaction product in feces.

[0055]

[Table 1]

健康人と透析患者における腸内菌叢の比較

	健康人	透析患者
腸内細菌科(Enterobacteriaceae)	6.9±0.3 (100)	8.7±0.2 ** (100)
エシェリキア・コリ	6.8±0.3 (100)	8.2±0.3 ** (100)
クレブシエラ属	5.2±0.3 (25)	7.4±0.4 * (35)
エンテロコッカス属	6.4±0.3 (100)	7.6±0.4 (100)
スタフィロコッカス属	2.5±0.1 (25)	3.2±0.3 (35)
シュードモナス属	4.8±1.0 (25)	3.3±0.3 (40)
カンジダ属	3.8±0.2 (50)	5.2±0.5 (50)
ビフィドバクテリア属	10.1±0.1 (100)	9.3±0.1 ** (65)
クロストリジウム・パーフリン ジェンス	4.9±0.3 (58)	6.6±0.4 * (70)
総菌数	10.7±0.1	10.5±0.1

Log₁₀ ±標準誤差 cfu/g 新鮮便 (検出率%)

* p < 5 %, ** p < 1 % (vs健康人、スチューデント t 検定)

[0056]

[Table 2]

透析患者における「レベニン(登録商標)」カプセル2週間服用における腸内菌叢の比較

	服用前	服用後
腸内細菌科(Enterobacteriaceae)	8.7±0.2 (100)	7.9±0.2 * (100)
エシェリキア・コリ	8.2±0.3 (100)	7.8±0.3 (100)
クレブシエラ属	7.4±0.4 (35)	7.2 (5)
スタフィロコッカス属	3.2±0.3 (35)	3.7±0.3 (15)
シュードモナス属	3.3±0.3 (40)	4.2±0.3 (20)
カンジダ属	5.2±0.5 (50)	5.3±0.5 (10)
ビフィドバクテリア属	9.3±0.1 (65)	9.4±0.1 (90)
クロストリジウム・パーフリン ジェンス	6.6±0.4 (70)	6.9±0.4 (25)
総菌数	10.5±0.1	10.7±0.1

Log₁₀ ±標準誤差 cfu/g 新鮮便 (検出率%)

* p < 5 % (vs服用前、スチューデント t 検定)

[0057]

[Table 3]

健康人と「ロロン(登録商標)S」錠服用前、後の透析患者の腸内菌叢の比較

	健康人	服用前	服用後
腸内細菌科 (Enterobacteriaceae)	6.9±0.3 (100)	8.1±0.4 * (90)	7.7±0.3 (100)
エシェリキア・コリ	6.8±0.3 (100)	8.0±0.5 * (70)	7.4±0.3 (100)
クレブシエラ属	5.2±0.3 (25)	7.9±0.6 * (50)	7.3±0.5 * (40)
エンテロコッカス属	6.4±0.3 (100)	7.2±0.6 (100)	7.9±0.3 ** (100)
スタフィロコッカス属	2.5±0.1 (25)	3.6±0.8 (30)	4.6 (10)
シュードモナス属	4.8±1.0 (25)	3.8 (10)	4.0±0.4 (30)
カンジダ属	3.8±0.2 (50)	5.5±0.7 * (40)	4.7±0.4 (50)
ビフィドバクテリア属	10.1±0.1 (100)	9.6±0.3 * (50)	9.5±0.1 ** (70)
クロストリジウム属	4.9±0.2 (100)	9.1±0.1 (100)	8.8±0.1 (100)
総菌数	10.7±0.1	10.5±0.1	10.7±0.1

Log₁₀ ±標準誤差 cfu/g 新鮮便 (検出率%)

* p < 5 %, ** p < 1 % (vs健康人、スチューデント t 検定)

[0058]

[Table 4]

「ロロン（登録商標）S」錠服用前、後の透析患者の糞便腐敗産物の比較

	服用前	服用後
フェノール	376.1±314.4	325.9±282.8
パラクレゾール	566.0±213.1	429.9±140.0
インドール	14.9±9.5	16.9±12.7
スカトール	189.1±115.9	66.2±52.9

平均±標準誤差 nmol/g 新鮮便

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the drawing in which change of the putrefaction-among feces product (a phenol, the Parakou resol, Indore, skatole) after the two week continuation recipe of "Lebenin (trademark)" capsules in a dialysis patient and usefulness are shown.

[Drawing 2] It is the drawing in which the accumulated dose of the uremic toxin component before and behind the dialysis in healthy people and a dialysis patient is shown.

[Drawing 3] It is the drawing in which change of the indoxyl sulfate in the plasma after the "Lebenin (trademark)" capsule recipe in a dialysis patient is shown.

[Drawing 4] It is the drawing in which the effectiveness of the "Lebenin (trademark)" capsule recipe done in the shape of [of a dialysis patient] fecal is shown.

[Translation done.]

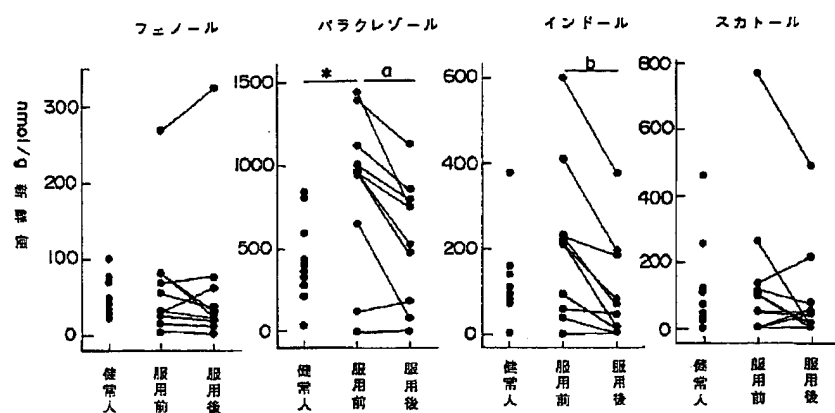
* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

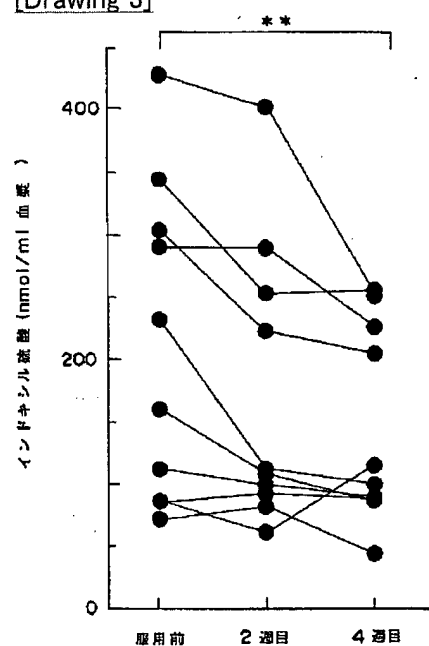
DRAWINGS

[Drawing 1]



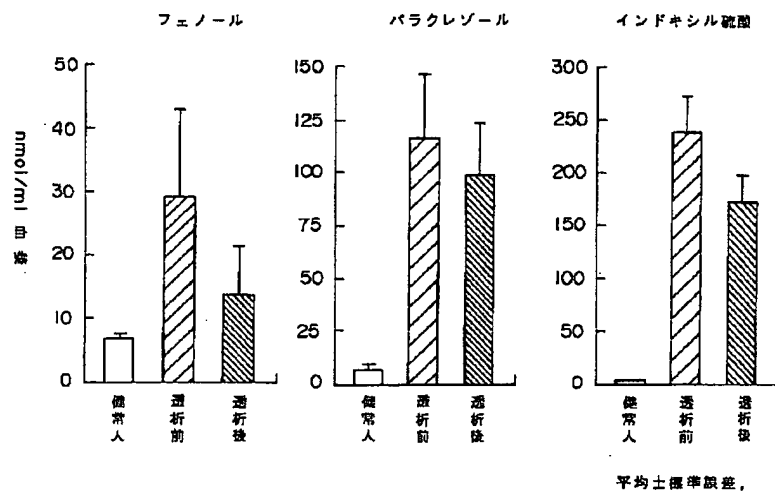
*: $p < 5\%$ (スチューデントt検定) a: $p < 1\%$, b: $p < 5\%$ (ペアードt検定)

[Drawing 3]

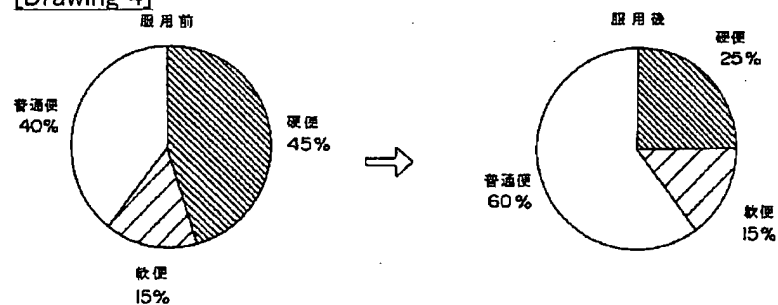


** : $p < 1\%$ (ペアードt検定)

[Drawing 2]



[Drawing 4]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-110707

(43) 公開日 平成9年(1997)4月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/74	ACV		A 6 1 K 35/74	ACVA
	AGZ			AGZ

審査請求 未請求 請求項の数2 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平7-289222

(22) 出願日 平成7年(1995)10月12日

(71) 出願人 000100492

わかもと製薬株式会社

東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号

(72) 発明者 飛田 美穂

東京都町田市玉川学園2-1-16

(72) 発明者 相場 勇志

東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか
もと製薬株式会社内

(72) 発明者 鈴木 信之

東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか
もと製薬株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性腎不全改善剤および透析患者のクオリティー オブ ライフ改善剤

(57) 【要約】

【構成】 慢性腎不全および透析患者の腸内菌叢の改善ならびに血中の尿毒症毒素成分 (u r e m i c t o x i n) の生成抑制と軽減を目的に、乳酸菌製剤を臨床の場で応用し、患者のクオリティー オブ ライフをはじめ臨床所見ならびに腸内菌叢の変化さらには腸内腐敗産物、血中の尿毒症毒素成分を調べた。

【効果】 尿中排泄の障害を持った慢性腎不全の患者もしくは尿中排泄のできない透析患者に対する乳酸菌製剤の投与は患者の生命予後に重要な働きを担っていることが判った。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 乳酸菌製剤を有効成分とする慢性腎不全改善剤および透析患者のクオリティー オブ ライフ改善剤。

【請求項2】 乳酸菌製剤が局外規ビフィズス菌、局外規ラクトミン、局外規耐性乳酸菌から選ばれる請求項1記載の慢性腎不全改善剤および透析患者のクオリティー オブ ライフ改善剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は慢性腎不全の改善および透析患者のクオリティー オブ ライフ (quality of life, QOL) の改善に効果的な医薬品に関する。

【0002】

【従来の技術ならびに発明が解決すべき問題点】日本における透析患者は1993年にはついに11万人を突破し、毎年約1万人以上が新たに透析導入に加わっている。また、透析にかかる1人当たりの医療費は月80万円、年額960万円にもなり、全国の透析患者の総医療費は約1兆円と云う膨大な費用が使われている。この額は何と国民総医療費24兆円に対して1/24に当たる。

【0003】透析患者の増加を抑えるためには、腎疾患に罹病した患者の早期発見と早期治療が望まれるところであるが、現在のところ有効な治療薬はまだ見出されていない。特に糖尿病の合併症の一つである糖尿病性腎症は患者の生命予後に直結するものであり、仮に透析を導入しても約3年間で50%の死亡率を示し極めて生命予後が悪い。

【0004】現在実施されている慢性腎不全の治療では低蛋白食を中心とした食事療法や降圧剤、降圧利尿剤などの薬物療法などのほかに、1991年より慢性腎不全用吸着剤クレメジン（登録商標）（呉羽化学一三共）が医薬品として登場した。本薬剤は新しい作用機序に基づいて尿毒症症状の改善と腎機能低下をできるだけ抑えることにより透析導入の遅延を狙って開発された薬剤である。

【0005】慢性腎不全の進展・増悪については、いくつかの考え方が提唱されているが、その一つに腎機能障害によって排泄機能が低下してしまうと尿毒症毒素 (uremic toxin) や尿毒症性代謝物などが体内に蓄積され、これらが腎不全をさらに悪化させ悪循環を来すことが考えられている。

【0006】このような腎不全の液性増悪因子の一つとして最近インドキシル硫酸が注目されている。食事として摂取した蛋白質はプロテアーゼによって加水分解され、低分子ペプチドあるいはアミノ酸となって大部分は小腸から吸収されるが、未吸収のペプチドやアミノ酸は腸内微生物によって代謝される。その中でもトリプトフ

アンはインドールに変換され、そのまま便中に排泄されるが、一部は腸管から吸収され血流に乗って肝に運ばれ、肝でインドキシルに変換後、インドキシル硫酸として抱合される。

【0007】通常、健康人であればこのインドキシル硫酸は腎を経て尿中に排泄されるが、腎障害を来した患者では、本物質が体内に貯留し、これが慢性腎不全の進展・増悪に大きく関わっていることが指摘されている。

【0008】慢性腎不全用経口吸着剤クレメジン（登録商標）は直径0.2～0.4mmの球形の高純度炭素微粒子からなるカプセル製剤であり、1カプセル200mg、1日服用量6gを1日3回に分けて服用する。

【0009】このような吸着剤は腸内に発生したフェノール類やインドール類などの腐敗産物を吸着することによって腸管からの腐敗産物の吸収を極力抑えるものであるが、本吸着剤は生体にとって大切なビタミン類やその他の栄養素、さらには消化酵素などにも吸着し、腐敗産物のみを選択的に吸着できる製剤ではない。さらに、慢性腎不全患者は厳格な水分制限を強いられており患者のQOLからみて1回、10カプセルと云う大量の吸着剤を1日3回、毎日飲み続けることは大きな負担となり決して望ましいことではない。また、服用後の腹部膨張感をはじめ便秘症状や食欲不振、悪心あるいは嘔吐など消化器系の副作用を伴う場合が多く、必ずしも患者のQOLを満足せしめるものではない。このような現状に鑑み、腸内腐敗産物の生成を抑制して慢性腎不全の進展・増悪を抑え、かつ、患者のQOLを向上させる薬剤が望まれている。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らはかかる実情に鑑み、慢性腎不全および透析患者のQOLを重視した腎不全改善薬の発明に鋭意研究した結果、すでに医薬品として認可されている乳酸菌製剤が非常に有効であることを突き止めた。

【0011】元来、乳酸菌製剤は、整腸薬として効能が認められており、かつ、長い間の使用経験から極めて安全性に優れた医薬品である。

【0012】最近の研究から乳酸菌製剤の有効成分であるビフィズス菌やラクトバチルス・アシドフィルス菌などはヒトや動物の腸内細菌として腸内に生息し、健康維持に極めて重要な働きをしていることが判明しており、また、以下に示す作用についても次第に明らかにされつつある。

【0013】(1)発癌物質などの有害物質の生成を抑制する。

(2)病原菌の腸管感染を防ぐ。

(3)腸内有害菌の増殖を抑える。

(4)ビタミンを合成する(ビタミンB₁, B₂, B₆, B₁₂, K)。

(5)消化・吸収を助ける。

(6) 免疫能を高める。

〔光岡知足：腸内菌の世界、叢文社（1980）〕

【0014】これらの作用はいずれも乳酸菌製剤の腸内菌叢のアンバランスを是正する働きによるものと考えられる。従来から腸内菌叢のバランスがくずれると重篤な感染症を引き起こす危険性のあることが指摘されていた。

【0015】特に、最近医療の現場で益々混乱を深め、社会問題にもなったMRSA感染症は広範囲抗生物質の使い過ぎと院内感染対策の遅れが指摘され大きな反省点となったが、本感染症にも広範囲抗生物質による腸内菌叢のバランスの崩壊が深く関与している。

【0016】すなわち、本発明者らが、MRSA菌で発症した患者の糞便を検索した結果、健康人の腸内菌叢を形成しているビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス属、ユウバクテリウム属、バクテロイデス属、クロストリジウム属などの嫌気性菌が全くと云って良いほど検出されず、代わりに好気性菌のMRSA菌を多量に検出した。このことから感染の成立あるいは感染防御の立場からみても、いかに腸内菌叢が重要であるかが理解できる。したがって、ヒトの健康と腸内菌叢との関わりは非常に大切である。

【0017】一方、安定期透析患者の腸内菌叢を解析した事例はほとんどなく、本発明を完遂するためにも重要な事項であった。透析患者は前述したごとく水分の制限のもとで、高カロリー、高脂肪、低蛋白、低食物繊維食を主体にした透析食を摂取し、さらに腸管の蠕動も減弱している症例も多く、便秘の合併もしばしば経験する症例に遭遇する。その結果、透析患者は、健康人とは異なる腸内菌叢で構成されている可能性があり、この腸内菌叢の異常が尿毒症毒素の血中での蓄積および易感染状態を作り上げている要因の一つと考えられる。

【0018】そこで本発明者らは比較例に示したように、健康人と透析患者の腸内菌叢を構成する菌種と菌数の比較を行い、その結果を表1に示した。表1から明らかなように、透析患者の腸内菌叢は健康者と比べて好気性菌の比率が高く、またヒトに有用なビフィズス菌の検出率も低い。さらに、透析患者は免疫能の低下も指摘されており、スタフィロコッカス属やエンテロコッカス属あるいはクレブシエラ属、シュドモナス属などの日和見感染菌が透析患者に高い検出率で認められたことは、患者の易感染状態と相乗して重大な日和見感染症を引き起こす危険性もある。このような透析患者における腸内菌叢の異常は本発明者らによって初めて明らかとなったものである。

【0019】そこで、本発明者らは腸内菌叢の異常を改善すると共に慢性腎不全および透析患者のQOLを改善する目的で、医薬品として認可されている乳酸菌製剤を実際の臨床の場で透析患者に投与し、投与前後の腸内菌叢の解析、尿毒症毒素成分、腐敗産物（フェノール、パ

ラクレゾール、インドール、スカトール）について分析を重ね解析を行った。その結果、透析患者における腸内菌叢の改善はもとより、腸内の腐敗産物の生成抑制と血中のインドキシル硫酸の減少を認めた。本結果は乳酸菌製剤の服用が慢性腎不全の改善および透析患者のQOLの改善に結び付くことを示すものである。

【0020】

【実施例】以下に本発明の端緒となった比較例を示し詳細に述べる。

10 【比較例】

《健康人と透析患者の腸内菌叢の比較》健康人12名（男性6名、女性6名、平均年齢49.2±6.8歳）および透析患者20名（男性8名、女性12名、平均年齢56.4±12.8歳）の乳酸菌製剤投与前の腸内菌叢を調べる目的で、光岡らの方法〔Microbiol. Immunol., 36, 683-694 (1992), Zentralbl. Bakteriolog., 1 Abt. Orig. A 195: 455-469 (1965)〕に従って、新鮮便約1gを採取し、嫌気条件下で懸濁後、 10^{-1} から 10^{-8} までに段階的に10倍希釈を行った。その各々の希釈液0.05mlをTS, EG, BLの3種類の非選択培地のアガープレートおよび以下に示す13種類の選択培地のアガープレート上に広げた。

【0021】DHL, TATAC, PEES, P, NAC [シュドモナス属検出用培地（栄研化学株式会社）]、NGBT, BS, ES, VS, 変法LBS, NN, CCFA [クロストリジウム・ディフシル検出用培地（オクソイド社、イギリス）]、2.5%の卵黄および5μg/mlのメチシリンを含むスタフィロコッカス培地No. 110（日本製薬株式会社）[MRSAおよびMSSA検出用培地]。

【0022】好気性菌検出用プレートは37℃、2日間、嫌気性菌検出用プレートは37℃、3日間インキュベーションして後、各プレート上のコロニー形状と細胞の形態、グラム染色、孢子形成能、好気性および嫌気性条件下での生育状況から判定して、各種細菌の分類と酵母類の帰属を行った。

【0023】その結果を表1に示したが、表1の数値は糞便1g当たりの生菌数（colony forming unit, cfu）を常用対数で示し、（ ）の数値は健康人12名または透析患者20名中に各菌が検出された人数から率を求め、これを検出率として表したものである。

【0024】《解析結果》表1の結果から、透析患者の糞便菌叢は健康人のそれと比較して腸内細菌科（Enterobacteriaceae）の菌数が有意に高く、腸球菌（エンテロコッカス属）もやや高い菌数を示し、全体的に好気性菌の比率が高いことが判った。さらに、日和見感染症の起因菌として注目されているスタフ

イロコッカス属やシュードモナス属の検出率は健常人に比べて透析患者の方が高値であった。

【0025】一方、嫌気性菌のビフィズス菌については、健常人全員から検出されたが（検出率100%）、透析患者では65%の検出率でその菌数も低い。また、老化との関連で最近注目されているクロストリジウム・パーフリンジェンスは、菌数、検出率ともに透析患者の方が高く、また総菌数は透析患者の方が若干低いことが判った。

【0026】以上、糞便菌叢の解析から、透析患者は健常人と比較して全般的に好気性菌の比率が高く、健常人の腸内菌叢とはかなり異なる腸内菌叢を有することが判った。

【0027】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本実施例は本発明の一態様を記載したものであって、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】

《「レベニン（登録商標）」カプセルの投与方法》透析患者20名（男性8名、女性12名、平均年齢56.4±12.8歳）に「レベニン（登録商標）」カプセルを食後に1回、1カプセル、1日3回、4週間服用させた。2週間後に患者の新鮮便と採血を行って、さらに2週間後に再び採血を行い、分析に供した。

【0028】「レベニン（登録商標）」カプセルは医療用医薬品として承認された抗生物質耐性乳酸菌製剤であり、1カプセル200mg中にビフィドバクテリウム・インファンティス 1×10^8 cfu、ラクトバチルス・アシドフィルス 1×10^8 cfu、エンテロコッカス・フェカリス 1×10^8 cfuの3菌種からなり総菌数として 3×10^8 cfu/カプセルを含む製剤である。

【0029】《「レベニン（登録商標）」カプセル投与後の腸内菌叢の検索》透析患者の糞便菌叢の検索は比較例に示した各種選択培地および非選択培地を用い同一の方法に従った。

【0030】《検索結果》表2の結果から、「レベニン（登録商標）」カプセルを服用した透析患者の糞便菌叢の変化として腸内細菌科（Enterobacteriaceae）について有意な減少が認められ、また、日和見感染の起因菌になりうるクレブシエラ、スタフィロコッカス、シュードモナス、カンジダ属は服用以前と比べると菌数および検出率ともに減少した。

【0031】一方、嫌気性菌については服用前後でビフィズス菌の検出率が65%から90%に増加したのに対し、クロストリジウム・パーフリンジェンスは70%から20%に減少し、総菌数では若干の増加をみた。以上より「レベニン（登録商標）」カプセルの服用によって腸内菌叢の改善が認められた。

【0032】《糞便中のフェノール類、インドール類の分析》

（分析方法）健常人12名、透析患者20名の糞便約0.5gずつ採取し、内部標準として10mMのパライソプロピルフェノールを10μlずつ添加し、1Nの塩酸0.5mlを加えて酸性とし、ジエチルエーテルを加えてよく混液して、3,000回転、15分間遠心分離を行い、上層を集め、再び0.5Mの重炭酸ソーダを加えてよく混液後、3,000回転、15分間遠心分離を行い、フェノール類およびインドール類を抽出した。フェノール類やインドール類を含むエーテル層から5μlをマイクロシリンジで精容後、ガスクロマトグラフィーに注液し分析を行った。

【0033】ガスクロマトグラフィーの測定条件は、以下の通りである。

分析装置：島津GC-9A

検出器：水素炎検出（FID）

キャリアーガス：ヘリウム（He）、50ml/分

カラム：ガラスカラム（長さ2.1m×直径3mm）

充填剤：14%シリコンSE-30クロモソルBW W-DWCS（80~100メッシュ）

温度：110℃（一定温度）

【0034】（分析結果）図1は、縦軸に糞便1g当たりのフェノール類、インドール類のナノモル量で示し、横軸に健常人および透析患者の「レベニン（登録商標）」カプセル服用前、服用後を示したものである。

【0035】健常人、透析患者ともにフェノール類のうち、パラクレゾールが最も多く、次いでスカトール、インドール、フェノールの順であった。健常人と服用前、服用後の透析患者のフェノールの量を比較してみると透析患者の1例が高い値を示したのみで他の健常人とほぼよく似た値であった。しかしながら、インドール、スカトール、パラクレゾールは健常人に比べ透析患者では高い値であった。2週間に及ぶ透析患者への「レベニン（登録商標）」カプセルの服用の結果、インドール、パラクレゾールおよびスカトールは減少し、腸内環境の改善がみられた。

【0036】《血漿中のフェノールとパラクレゾールおよび血漿中のインドキシル硫酸の分析》

（分析方法）

○血漿中のフェノールおよびパラクレゾールの分析

健常人12名、透析患者20名の採血を行って、血漿を分離し得られた血漿0.1mlに内部標準物質として1mMのパライソプロピルフェノールを5μlずつ添加し、4Nの塩酸10μlを加えて酸性とし、食塩0.1gを加え溶解後、0.2mlの酢酸エチルを加えてよく混液して、3,000回転、15分間遠心分離を行い、酢酸エチル層より5μlをマイクロシリンジで精容後、ガスクロマトグラフィーに注液して分析を行った。

【0037】ガスクロマトグラフィーの測定条件は、以下の通りである。

50 分析装置：島津GC-9A

検出器：水素炎検出（FID）

キャリアーガス：ヘリウム（He）、5.0 ml/分

カラム：ガラスカラム（長さ2.1 m×直径3 mm）

充填剤：14%シリコンSE-30クロモソルブW A W-DWCS（80～100メッシュ）

温度：100℃（一定温度）

【0038】○血漿中のインドキシル硫酸の分析

健康人12名、透析患者20名の採血を行って、血漿を分離し得られた血漿0.1 mlに0.3 Nの塩酸を等量加えて酸性とし、水飽和クロロホルム0.1 mlを加えてよく混液して、10,000回転、15分間遠心分離を行い、水層から4 μlをマイクロシリンジで精容後、高速液体クロマトグラフィーに注液し分析を行った。なお、定量に際し、標品のインドキシル硫酸（シグマ社）を用いて標準曲線をあらかじめ作成し、これを使用した。

【0039】高速液体クロマトグラフィーの測定条件は、以下の通りである。

分析装置：島津LC-6A

検出器：島津SPD-6A、UV検出（波長270 nm）

カラム：ODSシリカゲルカラム、YMC-Pack A-312（株式会社ワイエムシー）（長さ150 mm×直径6.0 mm）

移動相：1 mMのテトラノールマルーブチルアンモニウムハイドロキサイドを含む20 mMのナトリウム-カリウムリン酸緩衝液（pH 6.5）：アセトニトリル（75：25 v/v）

流速：1 ml/分

【0040】（分析結果）図2は健康人および透析患者の透析前、透析後の血漿中の尿毒症毒素成分の比較を示したものである。縦軸に血漿1 ml当たりの尿毒症毒素成分であるフェノール、パラクレゾール、インドキシル硫酸のナノモル量を表わし、横軸に健康人、透析前の患者、透析後の患者を示した。

【0041】図2から明らかなように、透析前の患者の血漿中には健康人に比べてフェノール、パラクレゾール、インドールの硫酸抱合体であるインドキシル硫酸が多量に蓄積されており、透析によってフェノールについては約60%が除去されるが、パラクレゾールやインドキシル硫酸は約10～20%程度しか除去できないことを示している。

【0042】尿毒症毒素成分の中でもインドキシル硫酸は腎不全の液性増悪因子の一つとして考えられており、また透析患者のQOLを考える上でこれら尿毒症毒素成分が血流に乗って体循環を繰り返すことは透析患者の生命予後に大きく影響するものと考えられる。

【0043】図3は透析患者に「レベニン（登録商標）」カプセルを最大4週間服用させて服用前と服用後の尿毒症毒素成分の一つであるインドキシル硫酸を追跡

したものである。フェノールやパラクレゾールについては減少した症例を認めたが有意差は認められなかった（データは呈示していない）。しかしながら、インドキシル硫酸については2週目で減少傾向を示し4週目では有意に減少した（ $p < 0.01$ ）。

【0044】（臨床症状）図4は透析患者の「レベニン（登録商標）」カプセル服用前と服用後2週目の糞便性状を観察したものである。判定基準は、軟便（水分81%以上）、普通便（水分71～80%）、硬便（水分70%以下）で示した。

【0045】図4からも明らかなように、「レベニン（登録商標）」カプセル服用前には硬便を呈した45%の患者が、服用後には25%に減少し普通便に改善された。

【0046】〔実施例2〕

《「ロロン（登録商標）S」錠剤の投与方法》男子5名、女子5名の透析患者計10名（平均年齢66.1±15.5歳）に「ロロン（登録商標）S」錠を食後に1回2錠、1日3回、1カ月間服用させた。1カ月後に患者の新鮮便を採取し糞便菌叢および腐敗産物の解析を行った。

【0047】「ロロン（登録商標）S」錠は一般用医薬品として承認された局外規ビフィズス菌、局外規ラクトミンからなる乳酸菌製剤であり、1錠200 mgの白色錠で1回服用量（2錠）中にビフィドバクテリウム・ロンガム 6×10^7 cfu、ビフィドバクテリウム・ビフィダム 6×10^7 cfu、ラクトバチルス・アシドフィルス 6×10^7 cfuの3菌種からなり、総菌数として 1.8×10^8 cfu/2錠を含む製剤である。

【0048】《透析患者の腸内菌叢の検索法》腸内菌叢の検索は比較例に示した各種選択培地および非選択培地を用い同一の方法に従った。

【0049】《検索結果》表3より明らかなように、「ロロン（登録商標）S」錠服用前の透析患者では、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）およびカンジダ属が健康人に比べ有意に菌数が高く、さらに日和見感染の起因菌として注目されているエンテロコッカス属やスタフィロコッカス属においても菌数が高く、好気性菌に富んだ菌叢を呈した。一方、嫌気性菌では健康人100%検出されたビフィドバクテリウム属が透析患者では50%程度の検出率に留まり、その菌数も有意に低いものであった。これらのことは、実施例1に示した「レベニン（登録商標）」カプセル服用前の成績とよく一致している。

【0050】しかしながら、「ロロン（登録商標）S」錠1カ月間の連続服用によって、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）およびカンジダ属は健康人に比べて有意差が認められない程度まで減少し、スタフィロコッカス属の検出率が若干の減少が認められるなど全体的に好気性菌の減少が認められた。

【0051】一方、嫌気性菌については今回ビフィドバクテリウム属の菌数には変化がみられなかったが、検出率の点では50%から70%に増加し、腸内腐敗菌とされているクロストリジウム属の菌数は若干の減少がみられた。以上、「ロロン（登録商標）S」錠の服用によって透析患者における腸内菌叢に改善が認められた。

【0052】《糞便中のフェノール類、インドール類の分析》

（分析方法）透析患者6名の糞便を約0.5gづつ採取し、フェノール類およびインドール類の抽出方法は実施例1に従った。

【0053】ガスクロマトグラフィーの測定条件は、以下の通りである。

分析装置：ヒューレットパッカードHP6890

検出器：水素炎検出（FID）

キャリアーガス：ヘリウム（He）1.32ml/分

カラム：J&W SCIENTIFIC社（California, USA）

キャピラリーカラム（長さ30m×直径250μm）*

*5%ジフェニルー95%ジメチルポリシロキサン（架橋結合型）

温度：50℃→180℃、昇温速度20℃/分

【0054】（分析結果）表4に示したごとく、「ロロン（登録商標）S」錠の服用前後における糞便中のフェノール、パラクレゾール、インドール、スカトールの腐敗産物を分析した結果、フェノール、パラクレゾールについては個人差が大きいものの若干の減少をみた。インドールについては、今回服用前の透析患者の糞便中のインドールの生成量は非常に少なく、「ロロン（登録商標）S」錠の服用後においても変化がみられなかったことから患者自身良好な状態が保たれているものと考えられる。一方、スカトールにおいては服用前と比べて激減していることから、「ロロン（登録商標）S」錠の長期服用が透析患者の腸内菌叢の改善と糞便中の腐敗産物の抑制に有用であることが明らかとなった。

【0055】

【表1】

健康人と透析患者における腸内菌叢の比較

	健康人	透析患者
腸内細菌科(Enterobacteriaceae)	6.9±0.3 (100)	8.7±0.2 ** (100)
エシェリキア・コリ	6.8±0.3 (100)	8.2±0.3 ** (100)
クレブシエラ属	5.2±0.3 (25)	7.4±0.4 * (35)
エンテロコッカス属	6.4±0.3 (100)	7.6±0.4 (100)
スタフィロコッカス属	2.5±0.1 (25)	3.2±0.3 (35)
シュドモナス属	4.8±1.0 (25)	3.3±0.3 (40)
カンジダ属	3.8±0.2 (50)	5.2±0.5 (50)
ビフィドバクテリア属	10.1±0.1 (100)	9.3±0.1 ** (65)
クロストリジウム・パーフリン ジェンス	4.9±0.3 (58)	6.6±0.4 * (70)
総菌数	10.7±0.1	10.5±0.1

Log₁₀ ±標準誤差 cfu/g 新鮮便（検出率%）

* p < 5%, ** p < 1% (vs健康人、スチューデントt検定)

【0056】

【表2】

透析患者における「レベニン（登録商標）」カプセル2週間服用における腸内菌叢の比較

	服用前	服用後
腸内細菌科(Enterobacteriaceae)	8.7±0.2 (100)	7.9±0.2 * (100)
エシェリキア・コリ	8.2±0.3 (100)	7.8±0.3 (100)
クレブシエラ属	7.4±0.4 (35)	7.2 (5)
スタフィロコッカス属	3.2±0.3 (35)	3.7±0.3 (15)
シュドモナス属	3.3±0.3 (40)	4.2±0.3 (20)
カンジダ属	5.2±0.5 (50)	5.3±0.5 (10)
ビフィドバクテリア属	9.3±0.1 (65)	9.4±0.1 (90)
クロストリジウム・パーフリン ジェンス	6.6±0.4 (70)	6.9±0.4 (25)
総菌数	10.5±0.1	10.7±0.1

Log₁₀ ±標準誤差 cfu/g 新鮮便（検出率%）

* p < 5% (vs服用前、スチューデントt検定)

【0057】

【表3】

健康人と「ロロン（登録商標）S」錠服用前、後の透析患者の腸内菌叢の比較

	健康人	服用前	服用後
腸内細菌科 (Enterobacteriaceae)	6.9±0.3 (100)	8.1±0.4 * (90)	7.7±0.3 (100)
エシェリキア・コリ	6.8±0.3 (100)	8.0±0.5 * (70)	7.4±0.3 (100)
クレブシエラ属	5.2±0.3 (25)	7.9±0.6 * (50)	7.3±0.5 * (40)
エンテロコッカス属	6.4±0.3 (100)	7.2±0.6 (100)	7.9±0.3 ** (100)
スタフィロコッカス属	2.5±0.1 (25)	3.6±0.8 (30)	4.6 (10)
シュードモナス属	4.8±1.0 (25)	3.8 (10)	4.0±0.4 (30)
カンジダ属	3.8±0.2 (50)	5.5±0.7 * (40)	4.7±0.4 (50)
ビフィドバクテリア属	10.1±0.1 (100)	9.6±0.3 * (50)	9.5±0.1 ** (70)
クロストリジウム属	4.9±0.2 (100)	9.1±0.1 (100)	8.8±0.1 (100)
総菌数	10.7±0.1	10.5±0.1	10.7±0.1

Log₁₀ ±標準誤差 cfu/g 新鮮便 (検出率%)

* p < 5%, ** p < 1% (vs健康人、スチューデントt検定)

【0058】

【表4】

「ロロン（登録商標）S」錠服用前、後の透析患者の糞便腐敗産物の比較

	服用前	服用後
フェノール	376.1±314.4	325.9±282.8
パラクレゾール	566.0±213.1	429.9±140.0
インドール	14.9±9.5	16.9±12.7
スカトール	189.1±115.9	66.2±52.9

平均±標準誤差 nmol/g 新鮮便

【図面の簡単な説明】

【図1】透析患者における「レベニン（登録商標）」カプセル2週間連続服用後の糞便中腐敗産物（フェノール、パラクレゾール、インドール、スカトール）の変化と有用性を示す図面である。

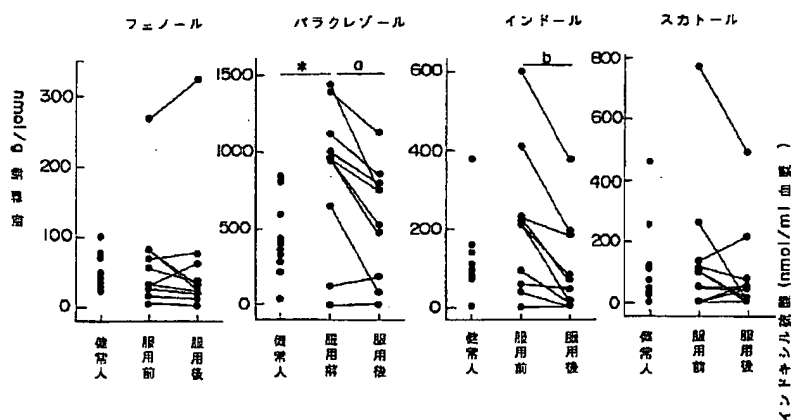
【図2】健康人および透析患者における透析前後の尿毒

症毒素成分の蓄積量を示す図面である。

【図3】透析患者における「レベニン（登録商標）」カプセル服用後の血漿中のインドキシル硫酸の変化を示す図面である。

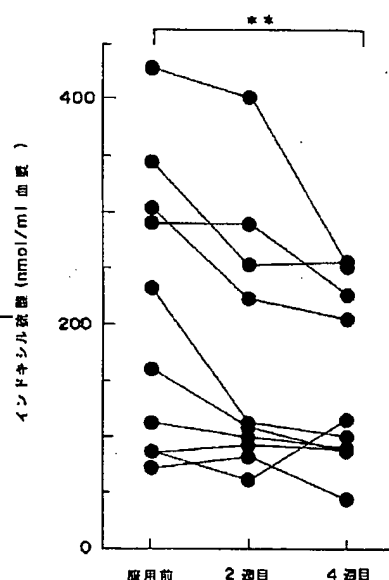
【図4】透析患者の糞便性状に及ぼす「レベニン（登録商標）」カプセル服用の効果を示す図面である。

【図1】



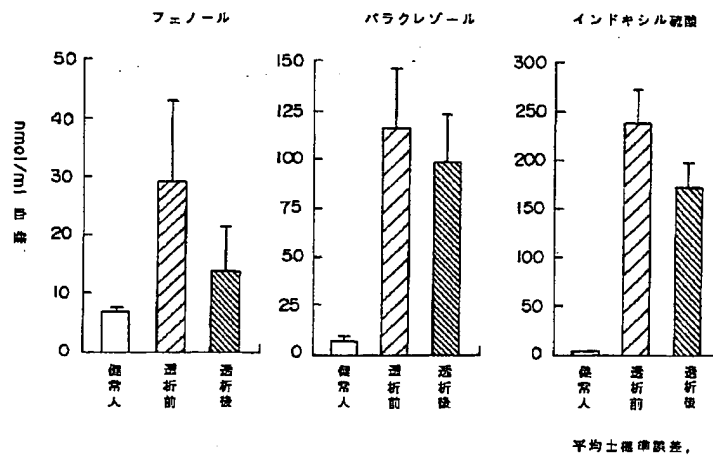
* : p < 5% (スチューデントt検定) a : p < 1%, b : p < 5% (ペアードt検定)

【図3】

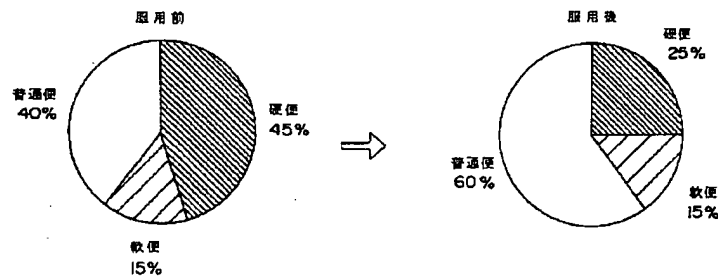


** : p < 1% (ペアードt検定)

【図2】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 小久保 直美
東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか
もと製薬株式会社内

(72)発明者 平田 晴久
東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか
もと製薬株式会社内

(72)発明者 大橋 良民
東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか
もと製薬株式会社内

(72)発明者 前田 孚
東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか
もと製薬株式会社内

(72)発明者 古賀 泰裕
神奈川県伊勢原市上粕谷246 東海大学伊
勢原職員住宅307